

# EASI-EXTRACT® VITAMIN B12

Produktcode: P80 / P80B

Immunaффinitätssäulen zur Verwendung in Kombination mit HPLC oder LC-MS/MS.  
Nur zum In-vitro-Gebrauch.

P80/V23/04.08.21

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



**R-BIOPHARM**  
**RHÔNE LTD**



# Inhalt

	<b>Seite</b>
Testprinzip .....	4
Nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien .....	4
Zubehörprodukte.....	4
Empfohlene Methoden und Applikationen .....	4
Gefahren .....	5
Dekontamination .....	5
Lagerung und Haltbarkeit .....	5
Probennahme .....	5
Sensitivität .....	5
Wiederfindung .....	6
Säulenvorbereitung.....	6
Rückspülung.....	6
Vorbereitung von Lösung A (Wasser mit einem Gehalt von 0,025 % TFA).....	6
Vorbereitung von 50 mM Natriumacetatpuffer .....	6
Probenvorbereitung .....	7
• Säuglingsanfangsnahrung und Kleinkindernahrung.....	7
• Milch.....	8
Vorbereitung von Standards.....	9
Kalibrierkurve.....	9
Empfohlene HPLC-Bedingungen .....	10
Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse von Babynahrung.....	11
Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse von Kuhmilch.....	11
Qualität.....	12
Technische Unterstützung.....	12
Garantie .....	12

## Testprinzip

Das Verfahren basiert auf monoklonaler Antikörpertechnologie, die den Test hochspezifisch, sensitiv, schnell und einfach durchführbar macht.

Die Säulen enthalten eine Gelsuspension des monoklonalen Antikörpers, der spezifisch für das jeweilige Vitamin ist. Im Anschluss an die Extraktion des Vitamins wird der Probenextrakt mit Puffer verdünnt, filtriert und langsam durch die Immunaффinitätssäule geleitet. Die in der Probe vorhandenen Vitamine werden vom Antikörper in der Gelsuspension gebunden. Die Säule wird anschließend gewaschen, um ungebundene Substanzen zu entfernen, darauf hin wird das Vitamin mit Lösungsmittel von der Säule eluiert. Das Eluat wird vor der HPLC- oder LC-MS/MS-Analyse gesammelt, evaporiert und rekonstituiert.

Die Extraktion und Reinigung dauert insgesamt ca. 2 Stunden. Das Ergebnis ist eine verbesserte Reinigung und Konzentration des Vitamins aus Lebensmittel- und Futtermittelproben, wodurch man ein viel saubereres Chromatogramm und somit eine genauere und sensitivere Detektion erhält. Die Säulen haben außerdem den Vorteil, dass sie für eine große Anzahl von Proben automatisiert werden können.

## Nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

- Destilliertes / deionisiertes Wasser
- Lösungsmittel (Methanol und Acetonitril HPLC-Qualität)
- Vitamin B12-Standard (siehe Abschnitt „Vorbereitung von Standards“)
- Natriumacetat
- Pepsin\*
- Trifluoressigsäure (TFA)
- Kaliumcyanid oder Natriumcyanid
- Takadiastase aus *Aspergillus oryzae* ( $\alpha$ -Amylase)\*
- Essigsäure

\* Bitte beachten. Es wird empfohlen alle Enzyme vor dem Einsatz auf den natürlichen Gehalt von Vitamin B12 zu überprüfen.

## Zubehörprodukte

- Whatman Nr. 113 oder Nr. 4 Filterpapier\*
- Immunaффinitätssäulenständer (RBRCR1)\*
- Immunaффinitätssäulen-Zubehörpaket (RBRAP01)\*

\* Erhältlich bei R-Biopharm AG.

## Empfohlene Methoden und Applikationen

Für alle unter der gesetzlichen Rechtsvorschrift stehenden Matrices und Rohstoffe stehen Applikationen bereit und auch für einige weitere Rohstoffe sind Methoden auf Anfrage verfügbar. Veränderungen oder Abweichungen bei der Handhabung der beschriebenen Durchführungsanweisungen des Handbuchs können zu einem nicht optimalen Ergebnis führen. Bitte wenden Sie sich an die R-Biopharm AG wenn sie weitere Informationen benötigen.

## **Gefahren**

Natriumcyanid und Kaliumcyanid sind hochtoxisch und kann korrosiven an den Gastrointestinaltrakt, Haut, Nase und Augen. Analysen sollten nur von Laboren durchgeführt werden, die über die entsprechende Ausrüstung zur Handhabung toxischer Substanzen und Lösungsmittel verfügen. Alle Schritte mit Natriumcyanid oder Kaliumcyanid sollte in einem gut belüfteten Abzug durchgeführt werden. Während der Analyse ist geeignete Schutzkleidung einschließlich Handschuhe, Schutzbrille und Laborkittel zu tragen.

Entzündliche Lösungsmittel müssen in einem explosions sicheren Schrank aufbewahrt werden. Je nach Anwendung ist eine Abdeckhaube und Schutzausrüstung zu verwenden.

Bitte wenden Sie sich an die R-Biopharm AG, wenn Sie ein Sicherheitsdatenblatt erhalten möchten.

## **Dekontamination**

Laborgeräte aus Glas sollten vor dem Gebrauch gründlich gewaschen und gespült werden, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

Überschüssiges Kaliumcyanid oder Natriumcyanid sollte vor der Entsorgung mit mindestens einem Zehntel ihres Volumen mit 5 % Natriumhypochlorit verdünnt werden. Laborgeräte und Abfälle, die mit Kaliumcyanid oder Natriumcyanid in Kontakt kamen, sollten in eine 5 % Natriumhypochlorit-Lösung für 30 Min eingetaucht werden. Nach der Inkubation eine 5 % Aceton-Lösung hinzugeben und weitere 30 Min inkubieren. Nach der Dekontamination und vor dem Entsorgen oder reinigen sollten die Gegenstände gründlich mit Wasser abgespült werden. Wenn es die Richtlinien erlauben oder vorschreiben, sollten die Abfälle verbrannt werden.

## **Lagerung und Haltbarkeit**

Die Säulen haben eine Mindesthaltbarkeit von 18 Monaten ab dem Herstellungsdatum, wenn sie bei 2 - 8 °C gelagert werden, bzw. von 12 Monaten ab dem Herstellungsdatum, wenn sie bei 21 - 25 °C gelagert werden. Die Säulen nicht einfrieren.

Es sollte sichergestellt werden, dass die Säulen nicht austrocknen und sich Puffer über dem Gel befindet. Wichtiger Hinweis! Der Antikörper in der Immunaффinitätssäule kann durch extreme Temperatur- oder pH-Änderungen denaturiert werden.

## **Probenahme**

Eine repräsentative Probe sollte entnommen werden. Es wird empfohlen, dass die repräsentative Probe fein gemahlen und ein Teil (1 - 10 g abhängig von der verwendeten Methode) hiervon abgenommen und extrahiert wird.

## **Sensitivität**

Die Sensitivität ist abhängig vom verwendeten Detektionssystem, das zur Analyse verwendet wird. Die Testsensitivität kann bei Bedarf verbessert werden, indem das Volumen der durch die Immunaффinitätssäule geleiteten Probe erhöht wird.

Um eine optimale Säulenleistung zu erhalten, wird unter Berücksichtigung der Quantifizierungsgrenze eines typischen HPLC-Systems eine Probe mit einem Gehalt von 0,01 - 0,5 µg Vitamin B12 auf die Säule aufgeben. Nicht die Konzentration von 1,0 µg überschreiten, da diese nahe der Säulenkapazität ist.

## Wiederfindung

Wenn ein Sie Verluste während der Extraktion berücksichtigen wollen, wird empfohlen, dass eine gespikete Probe der gleichen Matrix wie die zu analysierende Probe gemäß dem kompletten Verfahren wie ein Referenzstandard analysiert wird. Die mit der gespikten Probe erhaltene Wiederfindung kann dann verwendet werden, um die mit der Testprobe erhaltenen Ergebnisse zu korrigieren.

## Säulenvorbereitung

Die Immunaффinitätssäulen sollten vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Kappe vom oberen Ende der Säule entfernen und entsorgen. Die Säule mittels Adapter fest an einem Glasspritzenzylinder anbringen und in einen Immunaффinitätssäulen- oder einen Klemmständer stellen.

## Rückspülung

Die Rückspülung wird durchgeführt, um die Zeit zu erhöhen, in der das Lösungsmittel mit dem Antikörper in der Gelsuspension in Kontakt ist. Somit wird sichergestellt, dass das Toxin vollständig eluiert wird. Die Rückspülung wird durchgeführt, indem der Spritzenkolben während des Durchlaufs des Lösungsmittels durch die Säule sanft angehoben und abgesenkt wird. Dieser Prozess kehrt die Richtung des Eluatflusses um und sollte 3 Mal wiederholt werden.



## Vorbereitung von Lösung A (Wasser mit einem Gehalt von 0,025 % TFA)

Die Lösung sollten am Tag des Einsatzes frisch vorbereitet.

1. 2 Liter Wasser in einen Kolben geben.
2. 500 µl entnehmen und verwerfen.
3. 500 µl Trifluoressigsäure (TFA) zugeben.

## Vorbereitung von 50 mM Natriumacetatpuffer

Der puffer kann für bis zu 5 Tage aufbewahrt werden, wenn er bei Raumtemperatur gelagert wird.

1. 4,1 g Natriumacetat in einen Kolben einwiegen.
2. 950 ml Wasser zugeben.
3. Den pH-Wert mit Essigsäure auf pH 4,0 einstellen.
4. Mit Wasser bis auf 1 Liter auffüllen und prüfen, ob der pH-Wert immer noch bei pH 4,0 istliegt.

## Probenvorbereitung

### • Auf Getreide basierende Säuglings- und Kleinkind-Nahrung

1. 5 - 30 g gemahlene Probe in eine Braunglasflasche mit Schraubkappe einwiegen.
2. 50 ml 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,0) zugeben.
3. 0,5 g der  $\alpha$ -Amylase und 2 g Pepsin zugeben, die Lösung auf einen Magnetrührer stellen und 10 min mischen lassen.
4. 1 ml der 1 % Natriumcyanid-Lösung hinzugeben (Alternativ: 1 ml einer 1 % Kaliumcyanid-Lösung) und weitere 5 min mischen.
5. Die Probe in einem Schüttelwasserbad 30 min lang bei 37 °C inkubieren.
6. Die Probe in ein zweites Schüttelwasserbad geben und 30 min lang bei 100 °C inkubieren. Die Probe entnehmen und bei Raumtemperatur abkühlen lassen.
7. Den Extrakt in einen 100 ml Braunglas-Messkolben geben und bis zur Markierung mit 50 mM Natriumacetatpuffer auffüllen.
8. Die Probe filtrieren (z. B. durch ein Whatman S&S 597½ Filterpapier).
9. Das entsprechende Filtratvolumen (je nach der zu analysierenden Probe) entsprechend der nachstehenden Tabelle auf die Säule aufgeben. Das Filtrat mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute durch die Säule laufen lassen (oder die Probe durch Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, wenn dies bevorzugt wird). Eine langsame, stetige Flussrate ist wichtig, damit das Vitamin vom Antikörper gebunden wird.

Zu analysierende Probe	Filtratvolumen
Säuglingsanfangsnahrung	5 - 10 ml
Nahrung (z. B. Getreide, Milchprodukte, Fleischhomogenat, Babynahrung)	15 - 30 ml

10. Die Säule mit 10 ml Wasser und einer Flussrate von etwa 5 ml pro Minute waschen. Anschließend Luft durch die Säule drücken, um Restflüssigkeit zu entfernen.
11. Das Vitamin aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mittels 3 ml 100 % Methanol eluieren und in einem 5 ml Glasröhrchen auffangen. Eine Rückspülung wird empfohlen. Siehe Abschnitt „Rückspülung“ für weitere Informationen.
12. Das Eluat bis zur vollständigen Trockene unter einem Luftstrom bei 60 - 70 °C evaporieren.
13. Mit 300 µl von der Lösung A rekonstituieren und 20 Sekunden lang vortexen.
14. 100 µl in das HPLC-System injizieren.

## Probenvorbereitung

### • Milch

1. 30 ml Probe in eine Braunglasflasche mit Schraubkappe einwiegen.
2. 50 ml 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,0) zugeben.
3. 0,25 g der  $\alpha$ -Amylase und 1 g Pepsin zugeben, die Lösung auf einen Magnetrührer stellen und 10 min mischen lassen.
4. 1 ml der 1 % Natriumcyanid-Lösung hinzugeben (Alternativ: 1 ml einer 1 % Kaliumcyanid-Lösung) und weitere 5 min mischen.
5. Die Probe in einem Schüttelwasserbad 30 min lang bei 37 °C inkubieren.
6. Die Probe in ein zweites Schüttelwasserbad geben und 30 min lang bei 100 °C inkubieren. Die Probe entnehmen und bei Raumtemperatur abkühlen lassen.
7. Den Extrakt in einen 100 ml Braunglas-Messkolben geben und bis zur Markierung mit 50 mM Natriumacetatpuffer auffüllen.
8. Die Probe filtrieren (z. B. durch ein Whatman S&S 597½ Filterpapier).
9. Das entsprechende Filtratvolumen (je nach der zu analysierenden Probe) entsprechend der nachstehenden Tabelle auf die Säule aufgeben. Das Filtrat mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute durch die Säule laufen lassen (oder die Probe durch Schwerkraft durch die Säule laufen lassen, wenn dies bevorzugt wird). Eine langsame, stetige Flussrate ist wichtig, damit das Vitamin vom Antikörper gebunden wird.

Zu analysierende Probe	Filtratvolumen
Kuhmilch, Sojamilch	10 ml
H-Milch	20 ml

10. Die Säule mit 10 ml Wasser und einer Flussrate von etwa 5 ml pro Minute waschen. Anschließend Luft durch die Säule drücken, um Restflüssigkeit zu entfernen.
11. Das Vitamin aus der Säule mit einer Flussrate von 1 Tropfen pro Sekunde mittels 3 ml 100 % Methanol eluieren und in einem 5 ml Glasröhrchen auffangen. Eine Rückspülung wird empfohlen. Siehe Abschnitt „Rückspülung“ für weitere Informationen.
12. Das Eluat bis zur vollständigen Trockene unter einem Luftstrom bei 60 - 70 °C evaporieren.
13. Mit 300 µl von der Lösung A rekonstituieren und 20 Sekunden lang vortexen.
14. 100 µl in das HPLC-System injizieren.



## Vorbereitung von Standards

Cyanocobalamin-Pulver kann käuflich bei verschiedenen Herstellern erworben werden. Das Pulver wird aufgelöst, um eine Konzentration von 1.000 µg/ml zu erhalten. Über Nacht bei 2 - 8 °C stehen lassen, um eine Stammlösung zu erhalten. Alle Standards sollten in Braunglasflaschen präpariert werden.

### Kalibrierkurve

Es wird empfohlen, mindestens eine 3 bis 6-Punkt-Kalibrierkurve zu erstellen. Durch die Konstruktion einer geeigneten Kurve müssten die Kalibrierstandards den Bereich oder Abschnitte der erwarteten Ergebnisse abdecken. Die verdünnten Standardlösungen sollten am Tag des Einsatzes frisch vorbereitet und innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden verwendet werden.

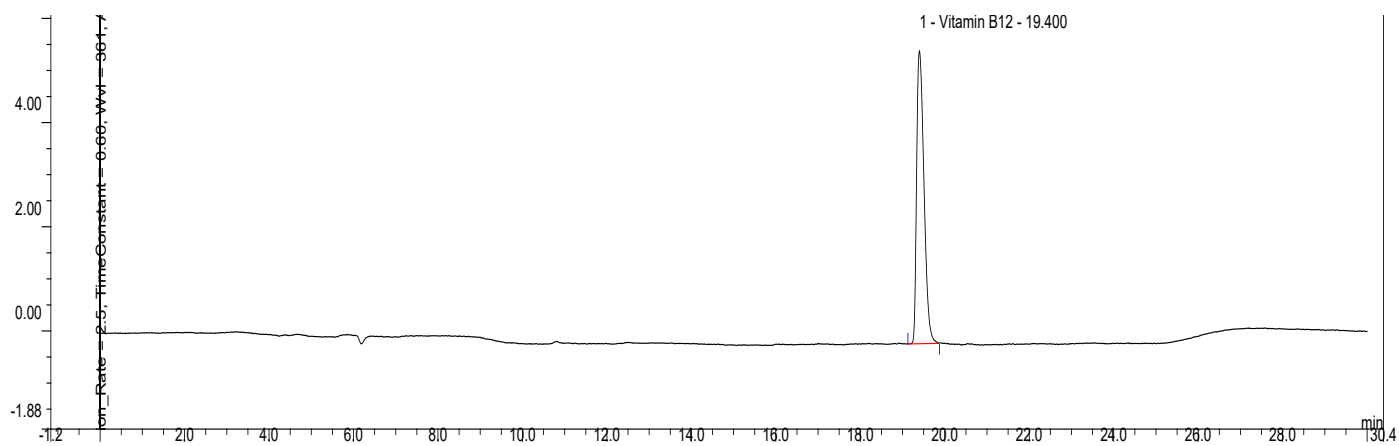
Beispiel der Herstellung einer vier Punkt Kalibrierkurve. (Diese kann je nach erwarteter Vitaminkonzentration angepasst werden):

1. Von 100 ml Wasser 1 ml abnehmen und verwerfen.
2. 1 ml vom 1 mg/ml Cyanocobalamin-Standard zugeben, um eine Cyanocobalamin-Lösung von 10 µg/ml zu erhalten.
3. Standard 4: 8 ml von der Lösung A nehmen und 120 µl entfernen und verwerfen. 120 µl von der 10 µg/ml Lösung (äquivalent zu 0,15 µg/ml) zugeben.
4. Standard 3: 1 ml von der 0,15 µg/ml Lösung nehmen und 1 ml von der Lösung A zugeben (äquivalent zu 0,075 µg/ml).
5. Standard 2: 1 ml von der 0,075 µg/ml Lösung nehmen und 1 ml von der Lösung A zugeben (äquivalent zu 0,0375 µg/ml).
6. Standard 1: 1 ml von der 0,0375 µg/ml Lösung nehmen und 1 ml von der Lösung A zugeben (äquivalent zu 0,01875 µg/ml).
7. 100 µl jeder Lösung als Eichkurve in das HPLC-System injizieren.

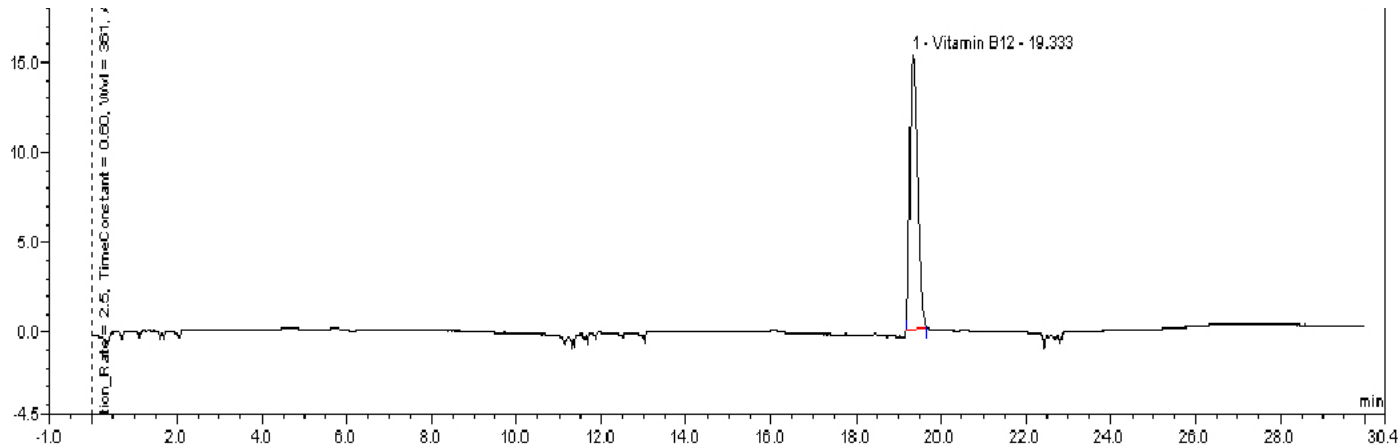
## Empfohlene HPLC-Bedingungen

HPLC-Bedingungen			
Vorsäule	ACE 3 C18 3 µm, 4 mm x 10 mm oder Äquivalent		
Analytische Säule	C18 ACE 3 AQ 3 µm, 3 mm x 150 mm oder Äquivalent		
Mobile Phase	Lösung A: 0,025 % TFA in Wasser (pH 2,6) Lösung B: Acetonitril Frisch am Tag des Einsatzes vorbereiten.		
Gradientenbedingungen	Zeit (min)	% Lösung A	% Lösung B
	0	100	0
	0.5	100	0
	11	85	15
	19	75	25
	20	90	10
	26	100	0
	30	100	0
HPLC-Pumpe	Für mobile Phase		
Flussrate	0,25 ml pro Minute		
UV-Detektor / Wellenlänge	361 nm		
Säulenheizung	Hält die Vor- und die Analytische Säule bei 30 °C		
Integrator / Datenkontrollsystem	Von bevorzugtem Anbieter		
Injektor	Autosampler / Rheodyne-Ventil		
Injektionsvolumen	100 µl		

## Typisches HPLC-Chromatogramm von Babynahrung



## Typisches HPLC-Chromatogramm von Kuhmilch



## Qualität

RBR-Produkte werden unter einem ISO 9001- registrierten Qualitätsmanagementsystem entwickelt, hergestellt, getestet und ausgeliefert, wodurch ein konsistentes Produkt gewährleistet wird, das stets unsere Leistungsspezifikationen erfüllt. Unsere Produkte wurden in vielen kollaborativen Studien eingesetzt, um europäische und internationale Standardmethoden zu entwickeln, und werden von vielen Schlüsselinstitutionen, Lebensmittelunternehmen und staatlichen Laboren verwendet. Kundenreferenzen für RBR-Produkte sind auf Anfrage erhältlich.

## Technische Unterstützung

RBR versteht, dass Benutzer unserer Produkte von Zeit zu Zeit Hilfe oder Beratung benötigen. Wir freuen uns daher, unseren Kunden die folgenden Serviceleistungen anbieten zu können:

- Analyse problematischer Proben.
- Anwendungshinweise für schwierige Proben.
- Referenzen aus der RBR-Bibliothek.
- Installation und Unterstützung der KOBRA® CELL.
- Beratung zu Detektionsparametern.
- Beratung zur Vorbereitung und Handhabung von Standards.
- Aktuelle Informationen zur Gesetzgebung, Probenentnahme und andere Neuigkeiten per E-Mail.
- Bereitstellung gespikter Proben.

Bitte wenden Sie sich an R-Biopharm AG, wenn Sie weitere Informationen erhalten möchten.

## Garantie

R-Biopharm Rhône Ltd gibt keine Garantie gleich welcher Art, weder ausdrücklich noch stillschweigend, mit Ausnahme der, dass alle von R-Biopharm Rhône Ltd hergestellten Produkte mit Materialien von geeigneter Qualität hergestellt sind. Sollten Materialien fehlerhaft sein, stellt R-Biopharm Rhône Ltd ein Ersatzprodukt bereit. Der Benutzer übernimmt sämtliche Risiken und Haftung, die sich aus der Verwendung von R-Biopharm Rhône Ltd-Produkten und Verfahren ergeben. R-Biopharm Rhône Ltd haftet für keinerlei Schäden, einschließlich spezieller oder Folgeschäden, Verlust oder Kosten, die direkt oder indirekt aus der Verwendung von R-Biopharm Rhône Ltd-Produkten oder Verfahren entstehen.





